



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 16 486 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 39/395**  
A 61 K 38/43

⑳ Aktenzeichen: 196 16 486.9  
㉔ Anmeldetag: 25. 4. 96  
㉕ Offenlegungstag: 30. 10. 97

**DE 196 16 486 A 1**

⑦① Anmelder:

Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,  
07745 Jena, DE

⑦② Erfinder:

Demuth, Hans-Ulrich, Dr., 06114 Halle, DE; Rosche,  
Fred, Dr., 06184 Dieskau, DE; Schmidt, Jörn,  
Dipl.-Chem., 06114 Halle, DE; Pauly, Robert P.,  
Vancouver, CA; McIntosh, Christopher H.S., Prof.  
Dr., Vancouver, CA; Pederson, Ray A., Prof. Dr.,  
Vancouver, CA

**PTO 2001-4361**

S.T.I.C. Translations Branch

⑤④ Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels in Säugern

⑤⑦ Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>) (o. a. GLP-1<sub>7-37</sub> oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Integrine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Integrin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße ...

**DE 196 16 486 A 1**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 09. 97 702 044/142

7/23

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden Effektoren (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRAUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., *Viral Proteinases. Ann. Rev. Biochem.* 57, 701(1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GÓMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖN, E., *Histochem.* 82, 41(1987)].

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W. H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidasen. *Mol. Cell Biochem.* 30, 111(1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophillin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., *FEBS-Letters* 260, 131(1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C. E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., *J of Immunology* 144, 2908 (1990)].

Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen

können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alanin-haltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R. W. and SCHERAGA, H. A., Folding and unfolding kinetics of the proline-toalanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden in vivo beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>), Hormone, die die Glukoseinduzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Integrine), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin in vitro und in situ abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B. and SCHMIDT, W. E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate in vivo kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV* (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R. G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert Diabetes mellitus Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Integrine begründet sind [BROWN, J. C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C. H. S., OTTE, S. C. and PEDERSON, R. A. Peptides 2, 241 (1981); SCHMIDT, W. E., SIEGEL, E. G., GALLWITZ, B., KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the insulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B. B., KNUDSEN, L. B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagonlike peptide. *J. Biol. Chem.* 269, 6275 (1994)].

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch Diabetes mellitus) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z. B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch ent-

scheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i. v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. *Sci. Amer.* 273 (1) 40–46 (1995)].

Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H. J., Hrsg., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J. E., SHEPHERD, T. A., JUNGHEIM, L. N., HORNBACK, W. J., HATCH, S. D., MUESING, M. A., WISKERCHEN, M. A., SU, K. S., CAMPANALE, K. M., BAXTER, A. J., and COLACINO, J. M., Potent, orally bioavailable HIV-I protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. *Bioorg. Medicinal Chem. Letters* 5 (23) 2897 (1995)].

Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP<sub>1–42</sub> und GLP-17–36 (o.a. GLP-17–37 oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Integrine (oder deren Analoga) zur Folge hat, d. h. durch Applikation von Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Proteine der Integrin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.
2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Integrine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.
3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-ana-

logen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Integrine in nachfolgender Veränderung der Glukoseinduzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulation des Blutglukosespiegels führt.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z. B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmirnetika Alanyl-Pyrrolidin, Isoleucyl-Thiazolidin sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur beschriebenen Methoden herstellbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z. B. i. v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z. B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolidinen ein solcher Dosissbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

##### Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Integrine GIP<sub>1–42</sub> und GLP-17–36 in situ

Sowohl in vitro mit gereinigtem Enzym als auch in situ, z. B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Integrine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

Erfindungsgemäß erreicht man in situ bei Inkubation von 30 µM GIP<sub>1–42</sub> bzw. 30 µM GLP-17–36 und 20 µM Isoleucyl-Thiazolidin (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20%-igem Serum bei pH 7.6 und 30°C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP<sub>1–42</sub> (5 µM) und synthetisches GLP-17–36 (15 µM) wurden mit humanem Serum (20%) in 0.1 mM TRICI-

NE Puffer bei pH 7.6 und 30°C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für  $\text{GIP}_{1-42}$  2.5 pmol und im Falle von  $\text{GLP}_{1-36}$  7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix co-kristallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

(1b) Die Signale im Bereich von  $m/z$  4980.1  $\pm$  5.3 entsprechen  $\text{GIP}_{1-42}$  (M4975.6) und  $m/z$  4745.2  $\pm$  5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt  $\text{GIP}_{3-42}$  (M4740.4).

(1c) Die Signale  $m/z$  3325.0  $\pm$  1.2 entsprechen  $\text{GLP}_{1-36}$  (M3297.7) und  $m/z$  3116.7  $\pm$  1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt  $\text{GLP}_{1-9-36}$  (M3089.6).

In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Integrine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

#### Beispiel 2

##### Inhibierung des Abbaus von $\text{GLP}_{1-42}$ durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid in vivo

Verfolgt man den Metabolismus der nativen Integrine (hier  $\text{GLP}_{1-36}$ ) im Serum der Ratte in Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (i. v. Injektion einer 1.5  $\mu\text{M}$  Inhibitorlösung in 0.9%-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren ( $n = 5$ ) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulinotropen Peptidhormons  $\text{GLP}_{1-36}$  zu beobachten (Abb. 2).

Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger i. v.-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere i. v. 50–100 pM  $^{125}\text{I}$ - $\text{GLP}_{1-36}$  (spezifische Aktivität ca. 1  $\mu\text{MCl/pM}$ ). Blutproben wurden nach 2–5 min entnommen und das Plasma mittels 20% Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem  $\gamma$ -Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (count-per minute relativ zum Maximum angegeben).

#### Beispiel 3

##### Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i. v. Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid in vivo

An der durch intraduodenale (i.d.) Injektion Glukose-stimulierten Ratte, kann durch i. v. Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukosespiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die i. v. Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den i.d. Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung.

Abb. 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparame-

ter: A — DP IV-Aktivität, B — Plasma-Insulinspiegel, C — Blutglukosespiegel.

Die Versuchstiere ( $n = 5$ , männliche Wistar-Ratten, 200–225 g) erhielten als Initialdosis 1.5  $\mu\text{M}$  Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9%-iger Kochsalzlösung ( $\blacktriangle$ ) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor ( $\blacksquare$ ) (Kontrollgruppe  $n = 5$ ). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75  $\mu\text{M/min}$  über 30 min Versuchszeit (\*). Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitorfreie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  erhielten die Tiere i.d. eine Glukosedosis von 1 g/kg 40%-iger Dextroselösung (w/v).

Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen. Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R. A., BUCHAN, A. M. J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C. B. & BROWN, J. C. Reg. Peptides 3, 53–63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV, in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R. G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1–35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

#### Patentansprüche

1. Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und Diabetes mellitus dient.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

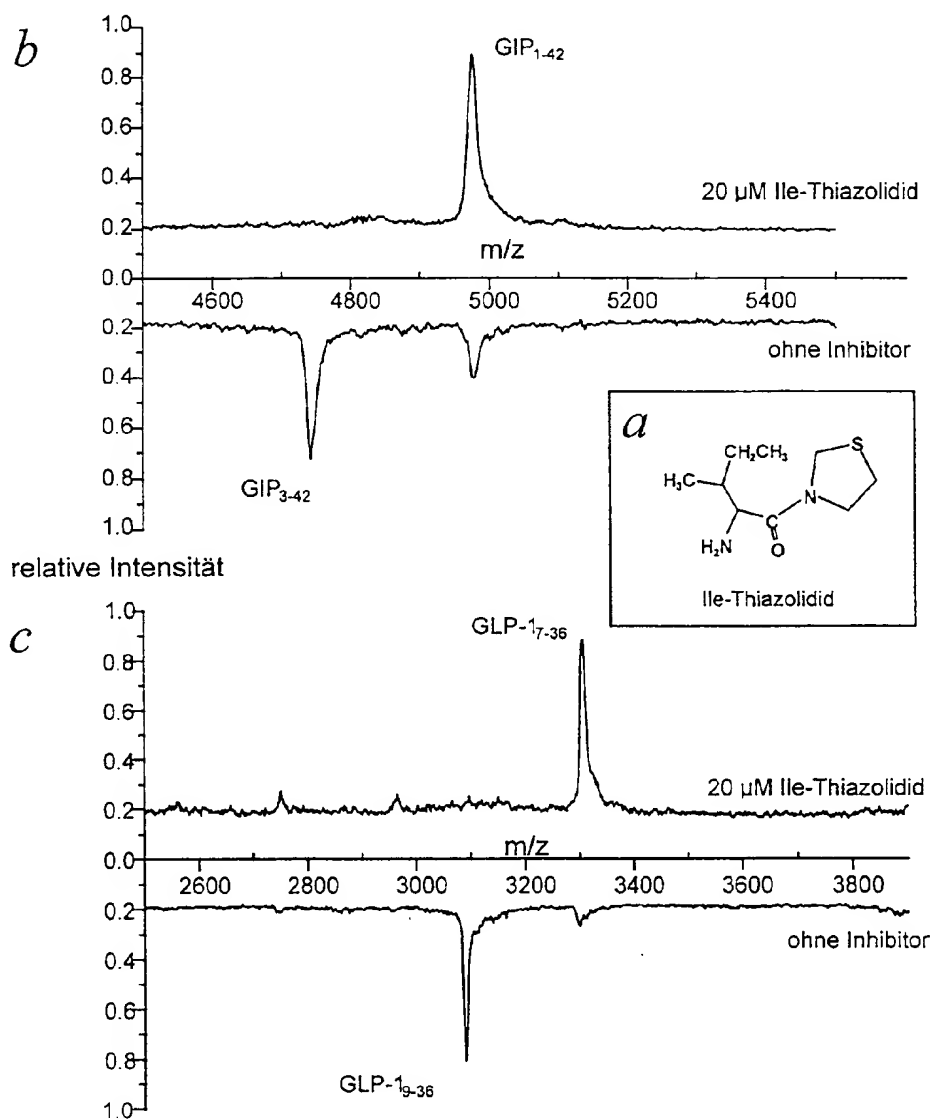


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP<sub>1-42</sub> (b) und GLP<sub>1-7-36</sub> und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

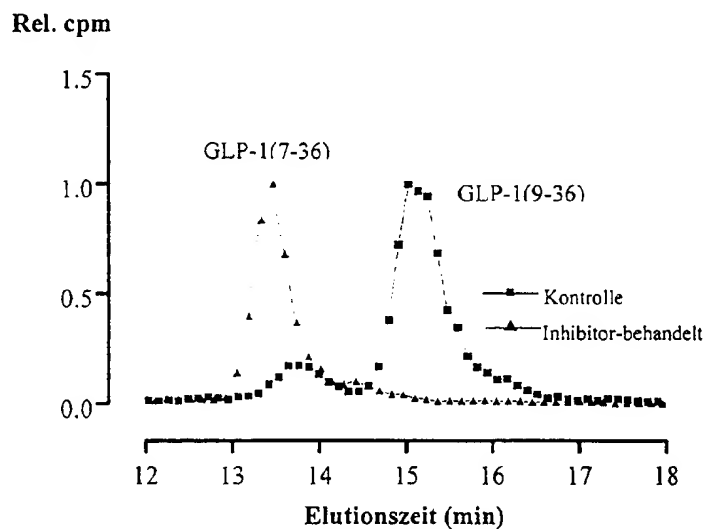


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

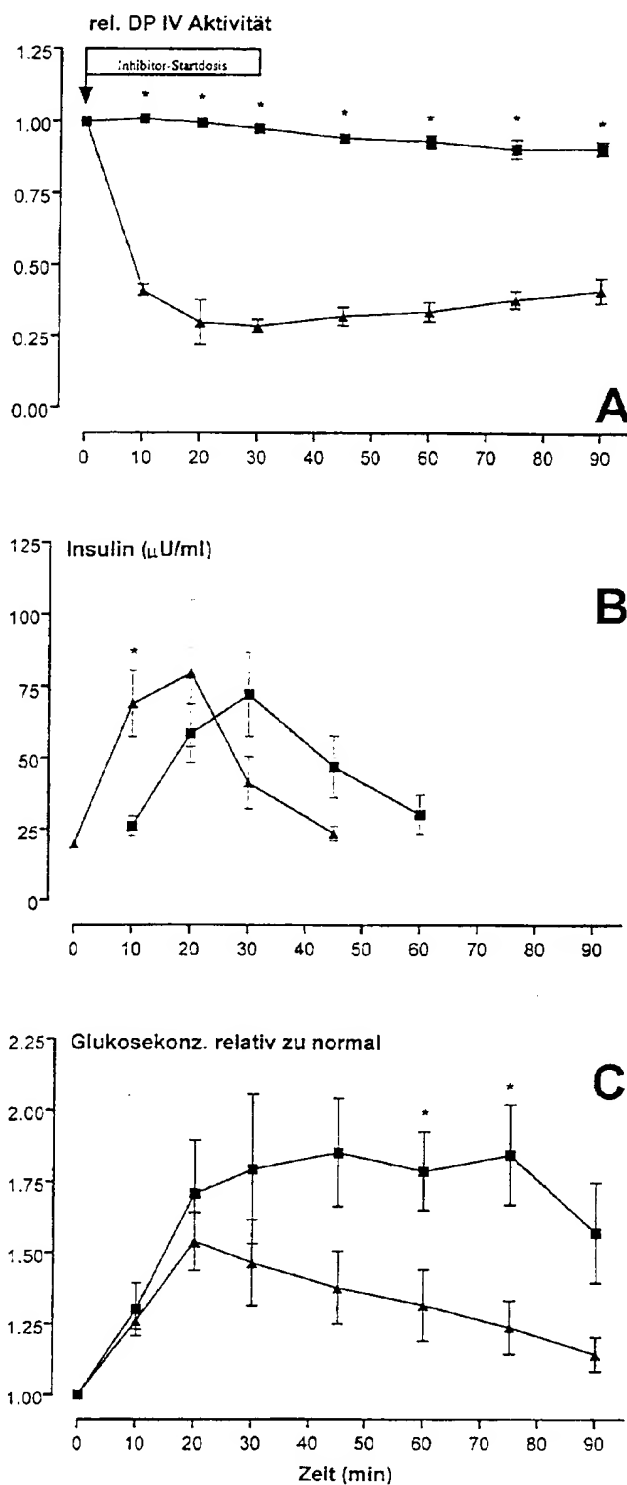


Abb. 3 Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der *i.d.*-Glukose-stimulierten Ratte.



**WEST****Generate Collection**

L3: Entry 21 of 22

File: DWPI

Jul 4, 2001

DERWENT-ACC-NO: 1997-527725  
DERWENT-WEEK: 200138  
COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Medical use of dipeptidyl peptidase IV inhibitors - for lowering blood sugar levels

INVENTOR: DEMUTH, H; MCINTOSH, C H S ; PAULY, R P ; PEDERSON, R A ; ROSCHE, F ; SCHMIDT, J ; MCLNTOSH, C H

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE	CODE
PROBIODRUG GES ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH	PROBN
KNOELL INST NATURSTOFF FORSCHUNG EV HANS	KNOEN
BIOLOGICAL DRUG REAGENTS PHARM RES CO	BIOLN
KNOELL INST NATURSTOFF FORSCH EV HANS	KNOEN
PROBIODRUG GMBH	PROBN

PRIORITY-DATA: 1996DE-1016486 (April 25, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
EP 896538 B1	July 4, 2001	G	000	A61K031/425
DE 19616486 A1	October 30, 1997	N/A	007	A61K039/395
WO 9740832 A1	November 6, 1997	G	021	A61K031/425
AU 9730233 A	November 19, 1997	N/A	000	A61K031/425
EP 896538 A1	February 17, 1999	G	000	A61K031/425
DE 19616486 C2	August 12, 1999	N/A	000	A61K045/00
CN 1216468 A	May 12, 1999	N/A	000	A61K031/425
NZ 332707 A	October 28, 1999	N/A	000	A61K031/425
AU 721477 B	July 6, 2000	N/A	000	A61K031/425
MX 9808143 A1	June 1, 1999	N/A	000	A61K031/425
EP 1084705 A2	March 21, 2001	G	000	A61K031/425
KR 2000064559 A	November 6, 2000	N/A	000	A61K031/425

DESIGNATED-STATES: AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC NL PT RO  
SE SI AU CA CN JP KR MX NZ RU US AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT  
SE AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC NL PT RO SE SI AL AT BE  
CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC NL PT RO SE SI

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
EP 896538B1	April 24, 1997	1997EP-0924866	N/A
EP 896538B1	April 24, 1997	1997WO-DE00820	N/A
EP 896538B1	April 24, 1997	2000EP-0119496	Related to
EP 896538B1		EP 1084705	Related to
EP 896538B1		WO 9740832	Based on
DE 19616486A1	April 25, 1996	1996DE-1016486	N/A
WO 9740832A1	April 24, 1997	1997WO-DE00820	N/A
AU 9730233A	April 24, 1997	1997AU-0030233	N/A
AU 9730233A		WO 9740832	Based on
EP 896538A1	April 24, 1997	1997EP-0924866	N/A
EP 896538A1	April 24, 1997	1997WO-DE00820	N/A
EP 896538A1		WO 9740832	Based on
DE 19616486C2	April 25, 1996	1996DE-1016486	N/A
CN 1216468A	April 24, 1997	1997CN-0194017	N/A
NZ 332707A	April 24, 1997	1997NZ-0332707	N/A
NZ 332707A	April 24, 1997	1997WO-DE00820	N/A
NZ 332707A		WO 9740832	Based on
AU 721477B	April 24, 1997	1997AU-0030233	N/A
AU 721477B		AU 9730233	Previous Publ.
AU 721477B		WO 9740832	Based on
MX 9808143A1	October 2, 1998	1998MX-0008143	N/A
EP 1084705A2	April 24, 1997	1997EP-0924866	Div ex
EP 1084705A2	April 24, 1997	2000EP-0119496	N/A
EP 1084705A2		EP 896538	Div ex
KR2000064559A	April 24, 1997	1997WO-DE00820	N/A
KR2000064559A	September 7, 1998	1998KR-0707018	N/A

INT-CL (IPC): A61K 31/425; A61K 38/43; A61K 39/395; A61K 45/00

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 19616486A  
BASIC-ABSTRACT:

Use of ''effectors'' of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) activity for lowering the blood sugar level below the glucose concentration characteristic of hyperglycaemia in the serum of a mammal is new.

USE - Used for preventing or ameliorating ''pathological metabolic anomalies of the mammalian organism'' selected from glucosuria, hyperlipidaemia, metabolic acidosis and diabetes mellitus.

ABSTRACTED-PUB-NO:

EP 896538B  
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

Use of ''effectors'' of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) activity for lowering the blood sugar level below the glucose concentration characteristic of hyperglycaemia in the serum of a mammal is new.

USE - Used for preventing or ameliorating ''pathological metabolic anomalies of the mammalian organism'' selected from glucosuria, hyperlipidaemia, metabolic acidosis and diabetes mellitus.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/3

TITLE-TERMS : MEDICAL PEPTIDASE IV INHIBIT LOWER BLOOD SUGAR LEVEL

DERWENT-CLASS: B05

CPI-CODES: B14-F09;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M781 M903 P814 P816 V803 V814

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1997-168100

# Request Form for Translation

Translation Branch  
The world of foreign prior art to you.

Translations

U. S. Serial No. : 09/628,225

Requester's Name: Jeffrey Russell

Phone No. : 308-3175

Fax No. : 308-7401

Office Location: CDI-9807

Art Unit/Org. : 1553

Group Director: J. Chambers

Is this for Board of Patent Appeals? No

Date of Request: 7-20-2001

Date Needed By: Oct. 2001

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

## PTO 2001-4361

S.T.I.C. Translations Branch

Phone: 308-0881  
Fax: 308-0989  
Location: Crystal Plaza 3/4  
Room 2C01

### SPE Signature Required for RUSH:

### Document Identification (Select One):

**\*\* (Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form) \*\***

1. ☒ **Patent** Document No. B 196 16 486  
Language German  
Country Code DE  
Publication Date 10-30-1997

No. of Pages \_\_\_\_\_ (filled by STIC)

2. ☐ **Article** Author \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_

3. ☐ **Other** Type of Document \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_

### Document Delivery (Select Preference):

\_\_\_\_\_ Delivery to nearest EIC/Office Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

\_\_\_\_\_ Call for Pick-up Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

\_\_\_\_\_ Fax Back Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?

Yes (Yes/No)

Will you accept an English abstract?

No (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?

No (Yes/No)

### STIC USE ONLY

#### Copy/Search

Processor: \_\_\_\_\_

Date assigned: \_\_\_\_\_

Date filled: \_\_\_\_\_

Equivalent found: \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Doc. No.: \_\_\_\_\_

Country: \_\_\_\_\_

Remarks: \_\_\_\_\_

#### Translation

Date logged in: \_\_\_\_\_

PTO estimated words: \_\_\_\_\_

Number of pages: \_\_\_\_\_

In-House Translation Available: \_\_\_\_\_

In-House:

Translator: \_\_\_\_\_

Assigned: \_\_\_\_\_

Returned: \_\_\_\_\_

Contractor:

Name: \_\_\_\_\_

Priority: \_\_\_\_\_

Sent: \_\_\_\_\_

Returned: \_\_\_\_\_

PROCESS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS  
[Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels in Saeugern]

Hans-Ulrich Demuth, Fred Rosche, Joern Schmidt, Robert P. Pauly,  
Christopher H.S. McIntosh, and Ray A. Pederson

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C.                      October 2001

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

Country : Germany  
Document No. : 19,616,486  
Document Type : Document laid open (first  
publication without search report)  
Language : German  
Inventor : Hans-Ulrich Demuth, Fred Rosche,  
Joern Schmidt, Robert P. Pauly,  
Christopher H.S. McIntosh, and Ray  
A. Pederson  
Applicant : Hans-Knoell-Institut fuer  
Naturstoff-Forschung e.V., 07745  
Jena, Germany  
IPC : A61K 39/395, A61K 33/43  
Application Date : April 25, 1996  
Publication Date : October 30, 1997  
Foreign Language Title : Verfahren zur Senkung des  
Blutglukosespiegels in Saeugern  
English Title : **PROCESS FOR LOWERING THE BLOOD  
GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS**

### **Process for Lowering the Blood Glucose Level in Mammals**

The invention comprises the application of a process wherein, by reducing the dipeptidyl peptidase (DP IV) or DP IV-like enzyme activity in the blood of a mammal via the administration of effectors, the endogenous (or additional exogenously administrated) insulintropic peptides, gastric inhibitory polypeptides 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) and glucagon-like peptides, amide-1 7-36 (GLP-17<sub>36</sub>) (the mentioned GLP-1<sub>36</sub> or other the analogs) are less degraded by the DP IV and DP IV-like enzymes and, in this way, the concentration reduction of these peptide hormones or their analogs is reduced or delayed.

As a consequence of this, via the increased stability of the (endogenously existing or exogenously supplied) integrines or their analogs obtained by the effect of the DP IV effectors, which are available to a greater extent for the insulintropic stimulation of the integrine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, the effectiveness of the body's own insulin changes, which has as a consequence a stimulation of the hydrocarbon metabolism of the treated organism.

As a result, the blood sugar level drops below the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of the

---

<sup>1</sup> Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

treated organism. In this way, metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, as well as possible severe metabolic acidosis, diabetes mellitus, which are the consequence of longer increased glucose concentrations in the blood, can be reduced or soothed.

The [process] according to the invention...

/2

#### Description

The invention concerns a simple process for lowering the blood sugar concentration with the aid of activity-reducing effectors (substrates, pseudo-substrates, inhibitors, binding proteins, antibodies, among others) for enzymes with an activity which is comparable or identical to the enzymatic activity of the enzyme dipeptidyl peptidase IV.

Aside from proteases, which are included in the unspecific proteolysis, which in the end causes the degradation of proteins to amino acids, regulatory proteases are also known, which participate in the functionalization (activation, deactivation, modulation) of endogeneous peptide additives [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIDERANDERS, B., ANSORGE, S., and BOHLEY, P., Lysosomal Cysteine Proteases, Excerpta Medica (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRAUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases, Ann. Rev. Biochem. 57, 701 (1987)]. Especially in connection with the immunity research and



the neuropeptide research have been discovered a series of these so-called convertases, signal peptidases, or enkephalinases [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, F., LEFAGE, A., MARPAKCHI, N., and COHEN, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6648 (1988); ANSORGE, S. and SCHOEN E., Histochem. 82, 41 (1987)].

Because of the frequency of the occurrence of the amino acid proline in many peptide hormones and the structure properties of the peptides connected therewith, a function which is similar to that of one of the signal peptidases is discussed for the proline-specific peptidases [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides, Biopolymers 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H., and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo and Exopeptidases, Mol. Cell Biochem. 80, 111 (1989); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D., and SCHARPE, S., Proline Motifs and their Biological Processing, FASEB Journal 9, 736 (1995)]. The proline determines in these peptides via its special structure the conformation as well as also the stability of these peptides in that it protects the same from degradation via unspecific proteases [KESSLER, H., Conformation and Biologic Effect of Cyclic Peptides, Applied Chem. 94, 509 (1932)]. The enzymes which instead have a highly specific structure-modifying effect on sequences containing proline (HIV protease, cyclophyline, among others) are attractive goals of the current additives

research. Especially for the peptidases prolyl endopeptidase (PEP) and dipeptidyl peptidase IV (DP IV), which divided according to the proline, relationships between the modulation of the biologic activity of natural peptide substrates and their selective separation via these enzymes can be made possible. Therefore, one can assume that PEP plays a part in the learning or in the thought process and DP IV is involved in the signal transmission during the immune response [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA, K., and SUGITA, H., FEBS-Letters 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H., and FLEISCHER, B., Journal of Immunology 144, 2906 (1990)].

Similar to the extraordinary proline specificity of these enzymes, a high selectivity for the amino acid alanine is discussed within the typical recognition areas in the substrates of these enzymes, whereupon peptides containing alanine can take on a similar conformation as structure-analog proline-containing peptides. These properties of alanine-containing peptide chains were demonstrated a short time ago [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and Unfolding Kinetics of the Proline-to-alanine Mutants of Bovine Pancreatic Ribonuclease, A. Biochemistry 35 (9) 1548 (1996)].

DP IV or DP IV-like activity (for example, the cytosolic DP II has a substrate specificity almost identical to that of DP IV)

appear in the blood circulation, where they separate highly specific dipeptides from N-terminus biologically active peptides when proline or alanine represent the neighboring residues of the N-terminal amino acids in their sequences. Therefore, it is assumed that these enzymes participate in vivo in the regulation of polypeptides [VANHOOF, G., GOOSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D., and SCHARPE, S., Proline Motifs and their Biological Processing, FASEB Journal 9, 736 (1995)].

The glucose-dependent insulinotropic polypeptides: gastric inhibitory polypeptides 1-42 (GIP)<sub>(1-4)</sub> and glucagon-like peptides amide-1 7-36 (GLP<sub>(1-36)</sub>), hormones, which stimulate the glucose-induced insulin secretion of the pancreas (also integrines) are substrates of DP IV, since they can separate in vitro and in situ from the N-terminal sequences of these peptides the dipeptides tyrosinyl-alanine or histidyl-alanine [MENTLEIN, F., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV Hydrolyzes Gastric Inhibitory Polypeptides, Glucagon-like Peptides-1 (7-36) Amide, Peptide Histidine Methionine and is Responsible for their Degradation in Human Serum, Eur. J. Biochem. 214, 829 (1993)].

The reduction of this DP IV or DP IV-like enzyme activity for separating these substrates in vivo can serve to effectively inhibit undesirable enzyme activity under laboratory conditions as well as also in pathologic conditions of mammals [DEMUTH, H.-U., Recent Developments in the Irreversible Inhibition of Serine

and Cysteine Proteases, *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV, in *Dipeptidyl Peptidase IV* (CD 26) in *Metabolism and the Immune Response* (E. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995). For example, diabetes mellitus type II (also diabetes of the elderly) is based on a reduced insulin secretion or disorders in the receptor function, which among others are caused in the proteolytically-dependent concentration anomalies of the integrine [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAVE, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C., and PEDERSON, E.A., *Peptides* 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B., KUMMEL, H., EBERT, R., and CREUTZFELDT, W., Characterization of the Insulinotropic activity of Fragments Derived from Gastric Inhibitory Polypeptides, *Diabetology* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KUNDSSEN, L.B., and KIRK, O., Structure-activity Studies of Glucagon-like Peptides, *J. Biol. Chem.* 269, 65275 (1994)].

Hyperglycemia and the causes or side effects connected therewith (also diabetes mellitus) are treated according to the current state of the art by administering insulin (for example, from material isolated or also obtained by gene technology from cattle pancreas) to the different diseased organisms in different ways. All the processes known previously as well as the modern

ones are characterized by a high material expense, high costs, and often

/3

decisive impairments of the quality of life of the patient. The classic method (daily i.v. insulin injection, usually in the 1930s) treats the acute disease symptoms, but leads after long-term use, among other things, to severe vessel changes (atherosclerosis) and nerve damage [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation, Diabetes Care 16 (3) 76 (1993)].

Lately, the installation of subcutaneous depot implants (the insulin administration takes place by doses, and the daily injections are eliminated) as well as the implantation (transplant) of intact Langerhans cells in the pancreas gland or other organs or tissues, which is disturbed in their function, has been suggested. These transplants are technically complicated. They also represent a surgical intervention, which is fraught with risks, for the receiving organism and require therefore methods for suppressing or circumventing the immune system in cell transplants [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells, Sci. Americ. 273 (1) 40-46 (1995)].

The, if possible, oral application of highly refined low molecular enzyme inhibitors, instead, is an economically advantageous alternative, for example, with respect to invasive surgical technologies in the treatment of pathologic occurrences.

These enzyme inhibitors are therapeutically used in the meantime as immunosuppressive, antithrombotic, and AIDS virostatic treatments. By the chemical design of stability, transportation, and clearance properties, their effectiveness can be modified and adjusted to individual properties [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., Design of Enzyme Inhibitors as Drugs, Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACH, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, Orally Bioavailable HIV-1 Protease Inhibitors Containing Noncoded D-amino Acids, Biorg. Medicinal Chem. Letters 5 (23) 2987 (1995)].

The object of the invention is a simple and new process for lowering the blood glucose level, which can be attained according to the invention in that, by administering effectors to mammals, in causal sequence the endogenous (or also exogenously administrated) insulinotropic peptides GIP<sub>1-42</sub> and GLP-1<sub>1-39</sub> (among others, GLP-1<sub>1-39</sub> or their analogs) is less degraded by the DP IV or DP IV-like enzymes, and therefore the concentration reduction of these peptide hormones or their analogs is reduced or delayed.

The invention is based upon the surprising finding that a reduction of the DP IV or DP IV-like enzymatic activity acting on the blood circulation is the cause for influencing the blood sugar level. It was found that

1. the reduction of the DP IV or DP IV-like activity for a relative stability increase of the glucose-stimulated or externally supplied integrines (or their analogs) has as a consequence, that is, the integrine degradation in the blood can be controlled by applying effectors of the DP IV or DP IV-like proteins;
2. an increased biologic degradation stability of the integrines (or their analogs), which has as a consequence a change of the effectiveness of endogenous insulin;
3. which increase of stability of the integrines obtained by reduction of the DP IV or DP IV-like enzymatic activity in the blood results in the consequent change of the glucose-induced insulin effect, and leads therefore to a controllable modulation of the blood glucose level.

The effectors of the DP IV or DP IV-like enzymes applied according to the invention can be used in pharmaceutically applicable formulation complexes as inhibitors, substrates, pseudo-substrates, inhibitors of the DP IV expression, binding proteins, or antibodies of these enzyme proteins or combinations of these different substances, which reduce the DP IV or DP IV-like protein concentration in mammals. The effectors according to the invention are, for example, DP IV inhibitors such as the dipeptide derivatives or dipeptide mimetics alanyl pyrolidide, isoleucyl thiazolidide, as well as the pseudo-substrate N-valyl

prolyl, O-benzoyl hydroxyl amine. Compounds such as these are known from the literature [DEMUTH, H.-U., Recent Developments in the Irreversible Inhibition of Serine and Cysteine Proteases, J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990)] or can be produced in analogy to the methods described in the literature.

The process according to the invention represents a new procedure for lowering the high blood glucose level in the serum of mammals. It is simple, commercially useful, and suitable for use in human medicine for the treatment especially of diseases, which are based on above-average blood glucose values.

The effectors are administered in the form of pharmaceutical preparations containing the additive in combination with the usual carriers known from the state of the art. For example, they are applied parenterally (for example, i.v. in physiologic saline solution) or enterally (for example, orally, formulated with the usual carriers such as, for example, glucose).

In dependence upon their endogenous stability and their bioavailability should take place single but also multiple administrations of effectors to obtain the desired normalization of the blood glucose values. For example, in the case of aminoacyl thiazolididene, the dosage range of effector substance should lie between 1.0 mg and 10.0 mg of per kilogram.



## Exemplary Embodiments

### Example 1

#### In Situ Inhibition of the DP IV-catalyzed Hydrolysis of the Integrines GIP<sub>1-42</sub> and GLP-1<sub>1-36</sub>

In vitro with purified enzyme as well as also in situ, for example, in polarized human serum, the hydrolysis of integrines caused by DP IV or DP IV-like activity can be detected or suppressed with the aid of inhibitors (Fig. 1).

According to the invention, the complete in situ suppression of the enzyme-catalyzed hydrolysis of both peptide hormones is achieved by incubation of 30  $\mu$ M GIP<sub>1-42</sub> or 30  $\mu$ M GLP-1<sub>1-36</sub> and 20  $\mu$ M isoleucyl thiazolidide (1a), a reversible DP IV inhibitor in 20% serum with a pH of 7.6 and 30°C within 24 hours (1b and 1c, each upper spectra, synthetic GIP<sub>1-42</sub> (5  $\mu$ M) and synthetic GLP-1<sub>1-36</sub> (15  $\mu$ M) were incubated for 24 hours with human serum (20%) in 0.1 M

/4

of TRICINE puffer with a pH of 7.6 and 30°C. Samples of the incubation formulations (for GIP<sub>1-42</sub> of 2.5 pmol and in the case of GLP-1<sub>1-36</sub>, 7.5 pmol) were extracted at different times. The samples were co-crystallized with 2',6'-dihydroxy acetophenone as matrix and were analyzed by means of MALDI-TOF mass-spectrometry. The spectra (Fig. 1) represent accumulations of 250 individual laser shots per sample.

(1b) The signals in the range of  $m/z$   $4980.1 \pm 5.3$  correspond to  $GIP_{1-41}$  (M4975.6) and those in the range of  $m/z$   $4745.2 \pm 5.5$  to the DP IV hydrolysis product  $GIP_{1-39}$  (M4740.4).

(1c) The signals in the range of  $m/z$   $3325.0 \pm 1.2$  correspond to  $GLP-1_{1-41}$  (M3297.7) and those in the range of  $m/z$   $3116.7 \pm 1.3$  to the DP IV hydrolysis product  $GLP-1_{1-39}$  (M3089.6).

In the test formulations without inhibitor, the integrines were completely degraded during this time (Figs. 1b and 1c, each lower spectra).

#### Example 2

##### In Vivo Inhibition of the Degradation of $GLP_{1-41}$ via the DP IV Inhibitor Isoleucyl Thiazolidide

If the metabolism of the native integrines (here  $GLP-1_{1-41}$ ) in the serum of rats is followed in dependence in the presence of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide (i.v. injection of a  $1.5 \mu M$  inhibitor solution in 0.9% saline solution) with respect to a control, then, with a concentration of the inhibitor isoleucyl thiazolidide of approx. 0.1 mg/Kg of lab rat in the inhibitor-treated test animal ( $n = 5$ ), no degradation of the insulinotropic peptide hormone  $GLP-1_{1-41}$  was observed during the course of the testing time (Fig. 2).

To detect the metabolites in the presence and absence of the DP IV inhibitors (20 minutes after previous i.v. inhibitor or saline solution), the test or control animals received i.v. 50-

100 pM <sup>125</sup>I-GLP-1(9-33) (specific activity approx. 1 μM Ci/pM). Blood samples were extracted after 2-5 minutes and the plasma was extracted by means of 20% acetonitrile. Afterward, the peptide extract was separated by means of RP-HPLC and the radioactivity of the fractions was analyzed in a γ-counter. The found activity was in cpm (indicated at counts per minute to maximum).

### Example 3

#### In Vivo Modulation of the Insulin Effect and Drop of the Blood Glucose Level After i.v. Application of the DP IV Inhibitor Isoleucyl Thiazolidide

On the rat, which had been glucose-stimulated via an intraduodenal (i.d.) injection could be observed a time-delayed drop of the glucose level caused by the inhibitor effect via the i.v. administration of different DP IV effectors, for example, of 0.1 mg isoleucyl thiazolidide per Kg of rat. This effect is dosage-dependent and reversible after reducing the infusion of 0.05 mg/min of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide per Kg of rat. The i.v. application of the identical glucose quantities of inhibitor-treated and control animals shows no comparable difference in contrast to the i.d. glucose-stimulated test animals.

Fig. 3 clarifies these connections at the inhibitor-dependent changes of the plasma parameter: A - DP IV activity, B - plasma insulin level, C - blood glucose level.

The test animals ( $n = 5$ , male Wistar rats, 200-225 g) received as initial dose 1.5  $\mu\text{M}$  of isoleucyl thiazolidide in 0.9% saline solution (▲) or the same volume of 0.9% saline solution without inhibitor (■) (control group  $n = 5$ ). The test group received also an infusion of the inhibitor of 0.75  $\mu\text{M}/\text{min}$  over 30 minutes testing time (\*). The control group was infused during this same time with an inhibitor-free 0.9% saline solution. At the time point  $t = 0$ , the animals received i.d. a glucose dose of 1 g/Kg of 40% dextrose solution (w/v).

Blood samples were extracted from all the test animals at 10 minute intervals. Glucose measurements took place in the full blood (Lifescan One Touch II analyzer) during the DP IV activity and the insulin concentrations in the plasma were determined.

The insulin test applied herein is sensitive between 10 and 160 mU/ml [PEDERSON, F.A, BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B., & BROWN, J.C., Reg. Peptides 3, 53-63 (1982)]. The DP IV activity was spectrophotometrically determined [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.), R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. All the measured values are indicated as mean values with standard deviations.

### Patent Claims

1. Use of effectors of the dipeptidyl peptidase (DP IV) or DP IV-like enzyme activity for lowering the blood sugar level under the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of a mammal.
2. Use according to claim 1, characterized in that the administration of effectors of the DP IV or DP IV-like enzyme activity serves for preventing or lowering in mammals pathologic metabolism anomalies selected among glucosuria, hyperlipidimia, metabolic acidosis, and diabetes mellitus.
3. Use according to claim 1, characterized in that as effectors of the dipeptidyl peptidase (DP IV) or DP IV-like enzyme activity can be used substrates, pseudo-substrates, inhibitors of the DP IV expression, binding proteins, or antibodies of these enzyme proteins, or combinations of the mentioned effectors.

Attached hereto are 3 sheets of drawings

/5

- Blank Page -

16

Keys to Fig. 1: (1) 20  $\mu$ M Ile-thiazolidide; (2) without inhibitor; (3) relative intensity; (4) Ile-thiazolidide; (5) 20  $\mu$ M Ile-thiazolidide; (6) without inhibitor.

Fig. 1: MALDI-TOF Analysis of the DP IV Catalyzed Hydrolysis of GIP<sub>1-42</sub> (b) and GLP<sub>1-30</sub> and their Inhibition via Isoleucyl Thiazolidide (a)

17

Keys to Fig. 2: (1) Control; (2) Inhibitor-treated; (3) Elution Time (min).

Fig. 2: In Vivo HPLC Analysis of the Serum Presence of GLP-1 Metabolites in the Presence and in the Absence of DP IV Inhibitors Isoleucyl Thiazolidide

18

Keys to Fig. 3: (1) rel. DP IV activity; (2) inhibitor start dose; (3) Glucose conc. relative to normal; (4) Time (min).

Fig. 3: Influence of the DP IV Inhibitor Isoleucyl Thiazolidide on Different Blood Parameters of i.d. Glucose-stimulated Rats

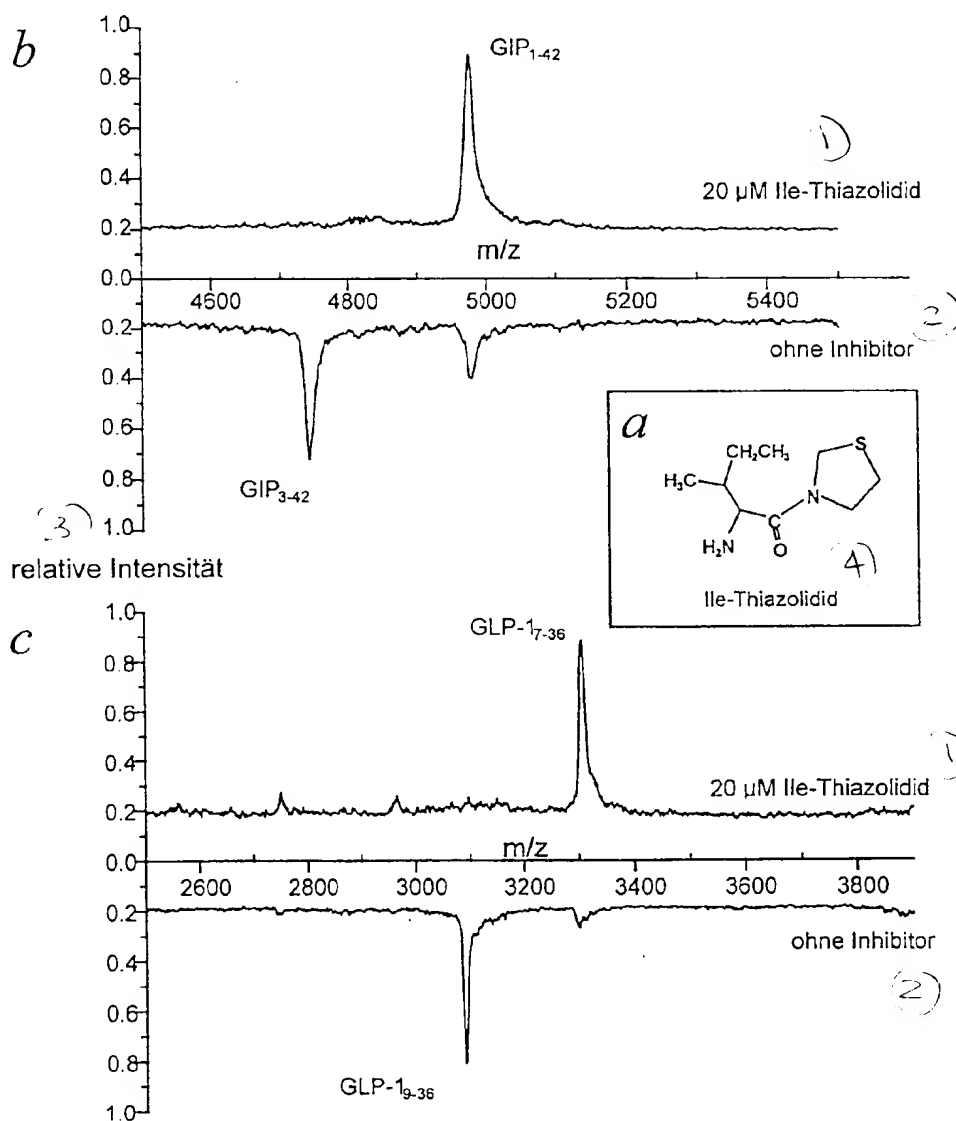


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP<sub>1-42</sub> (b) und GLP<sub>1-7-36</sub> und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

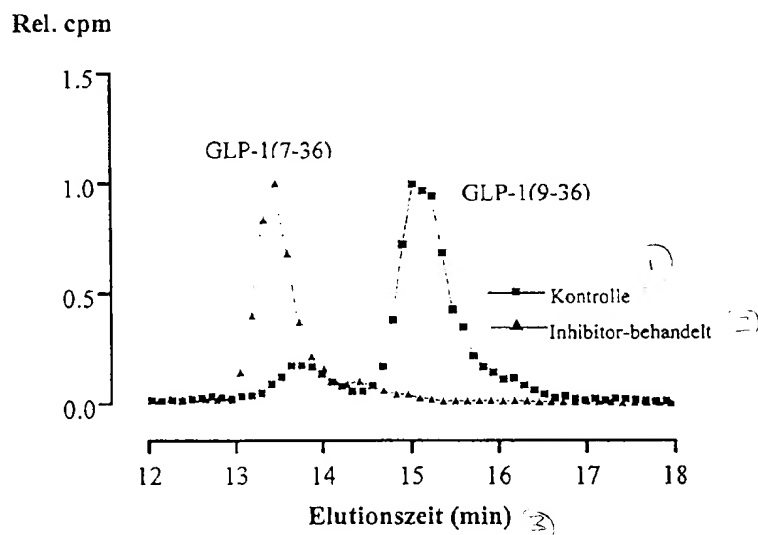


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.



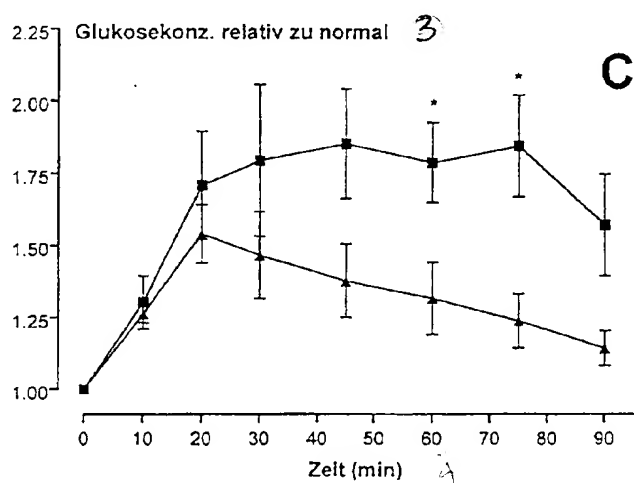
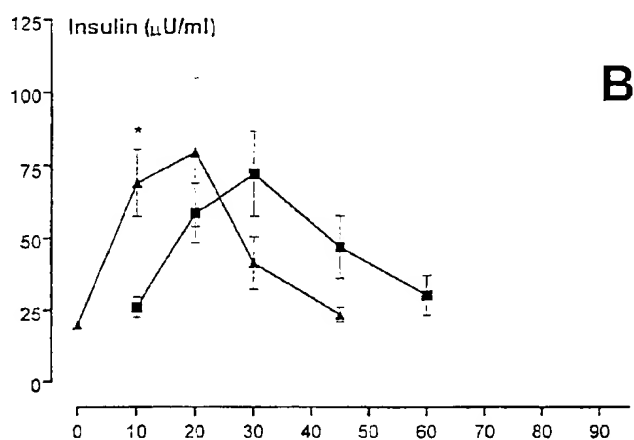
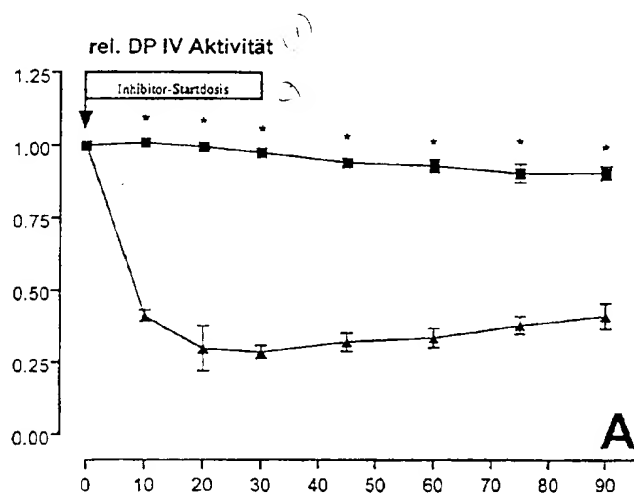


Abb. 3 Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der *i.d.*-Glukose-stimulierten Ratte.